



Expression of the oncoprotein gankyrin and phosphorylated-retinoblastoma protein in human testis and testicular germ-cell tumor.

著者	安東 聡
発行年	2014
その他のタイトル	ヒト正常精巣と精巣腫瘍における癌タンパク質ガンキリンとリン酸化Rbタンパクの発現について
学位授与大学	筑波大学 (University of Tsukuba)
学位授与年度	2014
報告番号	12102甲第7176号
URL	http://hdl.handle.net/2241/00125707

氏名（本籍）	安東 聡
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	博甲第 7176 号
学位授与年月	平成 26 年 12 月 31 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
審査研究科	人間総合科学研究科
学位論文題目	Expression of the oncoprotein gankyrin and phosphorylated-retinoblastoma protein in human testis and testicular germ-cell tumor. (ヒト正常精巣と精巣腫瘍における癌タンパク質ガンキリンとリン酸化 Rb タンパクの発現について)
主査	筑波大学教授 博士（医学） 竹越 一博
副査	筑波大学教授 医学博士 吉川 裕之
副査	筑波大学准教授 博士（医学） 鈴木 英雄
副査	筑波大学准教授 博士（医学） 南 優子

論文の内容の要旨

（目的）

癌タンパク質であるガンキリンは Retinoblastoma タンパク(Rb)のリン酸化や分解により細胞増殖を促進する。本研究ではヒト正常精巣と精巣腫瘍におけるガンキリンとリン酸化 Rb の発現について検討した。

（対象と方法）

精巣腫瘍細胞株 NEC8 のガンキリン発現を Locked nucleic acid(LNA)により抑制し、それによるリン酸化 Rb の発現や細胞増殖への効果を分析した。またガンキリンと Rb、リン酸化 Rb の発現を精巣腫瘍 93 例とヒト正常精巣 5 例において免疫組織化学で分析した。

（結果）

ウェスタンブロット分析では、NEC8 とヒト正常精巣、精巣腫瘍においてガンキリンは発現していた。LNA で NEC8 のガンキリンを抑制すると Rb のリン酸化と細胞増殖は抑制された。

ヒト正常精巣の免疫組織化学ではガンキリンは精母細胞優位に発現していた。精巣腫瘍ではセミノーマと胎児性癌においてガンキリンとリン酸化 Rb が高発現していた。一方で他の組織型ではガンキリンとリン酸化 Rb が低発現であった。

Growing teratoma (GT) と悪性転化した奇形腫 (TMT) の組織ではガンキリンは低発現であったがリン酸化 Rb は高発現であった。

(考察)

本研究では、正常精巣と精巣腫瘍におけるガンキリン発現の分析結果を示した。これまでに正常精巣での発現について報告した論文は無い。

精子形成過程においてガンキリンが精母細胞に優位に発現していることを示した。ガンキリンが Rb のリン酸化を通じて細胞周期を制御することと考え合わせると本研究結果はガンキリンが減数分裂時に Rb の制御を担っている可能性を示唆された。しかし精子形成過程におけるガンキリンの機能を明らかにするには遺伝子導入マウスやノックアウトマウスモデルを用いた更なる研究が必要である。

精巣腫瘍は急速に増殖し化学療法に高度な感受性がある腫瘍であり、精巣腫瘍の増殖制御機構を決定することは臨床的に重要である。対照的に典型的な奇形腫は緩徐に増殖するが、化学療法抵抗性である。一部の奇形腫成分は GT や TMT へ変化し悪性となる可能性がある。本研究では *in vitro* でガンキリンが機能的に発現していることを示し、免疫組織化学では精巣腫瘍の組織型毎の発現分析によりいくつかの興味深い発見をした。1) 免疫組織化学では原発巣のセミノーマと胎児性癌でガンキリンは高発現しており、他の組織型では低発現であった。精巣腫瘍原発巣ではどの組織型においてもガンキリンとリン酸化 Rb の発現パターンはよく相関していた。これは全組織型の中でセミノーマと胎児性癌において Ki-67 の発現レベルが高い (Cancer Sci. 102:267, 2011) とする過去の報告と一致している。ガンキリンが腫瘍増殖に関与する可能性が示唆された。2) *in vitro* では NEC8 のガンキリンを LNA で抑制すると Rb のリン酸化と細胞増殖は抑制された。これは免疫組織化学の結果を支持するものである。本研究ではガンキリンが Rb 経路を脱制御することに関与していることを示唆しているが、精巣腫瘍形成への関与を明らかにするには更なる研究が必要である。3) 転移巣に残存した奇形腫の Rb は高発現であるが、リン酸化 Rb は低発現であった。これは残存奇形腫の有する限定的な増殖活性に一致している。しかし残存奇形腫ではリン酸化 Rb が低発現であるにも関わらず、ガンキリンが予想外に高発現であった。他方で急速な増殖を示す GT と TMT ではガンキリンは低発現であるが、リン酸化 Rb は高発現であった。奇形腫成分と他の組織型ではガンキリンとリン酸化 Rb の発現パターンの乖離を認め、Rb のリン酸化を制御する分子機構に相違がある可能性が示唆された。4) 標本数は少ないが、化学療法抵抗性症例のサルベージ手術検体では、ガンキリンとリン酸化 Rb は生存細胞において高発現していた。転移巣に含まれていた絨毛癌と卵黄嚢腫瘍は化学療法未施行である原発巣のそれらよりもガンキリンとリン酸化 Rb は高発現であった。食道癌、大腸直腸癌でガンキリンが過剰発現していることは低生存率もしくは悪性の表現型であることが知られており、精巣腫瘍の化学療法抵抗性症例についてもガンキリンの役割を研究することは興味深いと思われる。

本研究での新発見として 1) 正常精巣中の特に精子形成過程にある精母細胞にガンキリンが発現している、2) ガンキリンとリン酸化 Rb はセミノーマと胎児性癌において高発現である、3) *in vitro* においてガンキリン発現を抑制させると Rb のリン酸化と細胞増殖が抑制される点が挙げられる。以上からガンキリンは精子形成過程と精巣腫瘍発生過程において Rb 経路の制御と脱制御に関与している可能性が示唆された。新規分子標的薬に対する反応の生物学的基盤をよく理解するには、精巣腫瘍発症機序のガンキリン・Rb 経路の更なる理解が必要である。

本研究の限界点としては 1) 主に免疫組織化学の結果によるものであり正常精巣や精巣腫瘍における

ガンキリンの機能を解析するには、より機能的な実験が必要であること、2) 症例数が限られており、臨床的な影響を確定出来なかった点が挙げられる。

審査の結果の要旨

(批評)

癌タンパク質であるガンキリンは Retinoblastoma タンパク(Rb)のリン酸化や分解により細胞増殖を促進する事が報告されている。本研究ではヒト正常精巣と精巣腫瘍におけるガンキリンとリン酸化 Rb の発現について検討している。本研究においてガンキリンは正常精巣の精母細胞と精巣腫瘍のセミノーマ、胎児性癌において優位に発現していた。GT と TMT を除いて、その発現は Rb のリン酸化とよく相関していた。これらのデータは精子形成過程や精巣腫瘍発症機序の分子機構に新たな知見を提供するものである。今後、ガンキリンの機能を明らかにするために遺伝子導入マウスやノックアウトマウス等を用いた更なる研究が期待される。

平成 26 年 10 月 30 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。